

Aus der Abteilung für Strahlenzytogenetik
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Horst Zitzelsberger
Helmholtz Zentrum München

Aufklärung von Markern und deregulierten Netzwerken der strahleninduzierten Mammakarzinogenese durch integrative Analyse von genomischer Kopienzahl, microRNA-, mRNA- und Protein-Expression



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christina Maria Wilke
aus Göttingen
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Horst Zitzelsberger

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2019

Für Felix und meine Eltern

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Aufklärung von Markern und deregulierten Netzwerken der strahleninduzierten Mammakarzinogenese durch integrative Analyse von genomischer Kopienzahl, microRNA-, mRNA- und Protein-Expression“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen, keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.05.2019

Christina Maria Wilke

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Abkürzungsverzeichnis..... | 3 |
| Publikationen in referierten Fachzeitschriften..... | 6 |
| Präsentationen | 8 |
| 1 Einleitung..... | 9 |
| 1.1 Mammakarzinom | 9 |
| 1.1.1 Epidemiologie und Histologie | 9 |
| 1.1.2 Risikofaktoren | 10 |
| 1.1.3 Mammakarzinom Kollektiv von Liquidatorinnen und Dosimetrie | 15 |
| 1.1.4 Molekulare Subtypen und Biomarker..... | 16 |
| 1.2 MicroRNAs..... | 20 |
| 1.3 Genomische Kopienzahlveränderungen..... | 23 |
| 1.4 Ziele der Arbeit..... | 25 |
| 2 Publizierte Ergebnisse | 27 |
| 2.1 Zusammenfassung | 27 |
| 2.2 Summary | 29 |
| 2.3 Beschreibung des Journals International Journal of Cancer | 32 |
| 2.3.1 International Journal of Cancer | 32 |
| 2.3.2 Radiation and Environmental Biophysics | 32 |
| 2.4 Eigener Beitrag zu den Publikationen..... | 32 |
| 2.4.1 International Journal of Cancer | 32 |
| 2.4.2 Radiation and Environmental Biophysics | 33 |
| 2.5 Publikationen | 34 |
| 2.5.1 Publikation 1: Expression of miRNA-26b-5p and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer | 34 |
| 2.5.2 Publikation 2: A genomic copy number signature predicts radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.3 Publikation 3: Doses of Ukrainian female clean-up workers with diagnosed breast cancer | 36 |
| 3 Schlussfolgerung und Ausblick..... | 37 |
| 4 Literaturverzeichnis..... | 41 |
| 5 Danksagung | 49 |

Abkürzungsverzeichnis

ADCC Antibody-dependent cellular cytotoxicity

AGO Argonaute-Proteine

Array-CGH Array Comparative Genomic Hybridization

BRCA1 Breast cancer gene 1

BRCA2 Breast cancer gene 2

CNA Copy number alterations

Cs Caesium

DNA Desoxyribonukleinsäure

EMT Epithelial-mesenchymale Transition

FFPE Formalin-fixed paraffin-embedded

FSH Follikelstimulierendes Hormon

GnRH Gonadotropin-Releasing Hormon

Her2/neu Human epidermal growth factor receptor 2

Hsa MiRNA des Homo sapiens

I Iod

IDC Invasiv duktales Karzinom

IGF1 Insulin-like growth factor 1

IHC Immunhistochemie

ILC Invasiv lobuläres Mammakarzinom

LH Luteinisierendes Hormon

mGy Milligray

miRNA MicroRNA

mRNA MessengerRNA

mSv Millisievert

NST Invasives Mammakarzinom vom nicht speziellen Typ

PCR Polymerase Chain Reaction

pre-miRNA Precursor miRNA

pri-miRNA Primary precursor miRNA

qRT-PCR Quantitative real time reverse transcription PCR

qPCR Quantitative real time PCR

Ra Radium

RADRUE Realistic Analytical Dose Reconstruction with Uncertainty Estimation

RISC RNA-induced silencing complex

RNA Ribonucleic Acid

| | |
|-------|---|
| SOPs | Standard operating procedures |
| TCGA | The Cancer Genome Atlas |
| TNM | Ausbreitung des Primärtumors, regionäre Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen |
| TRPS1 | Trichorhinophalangeal syndrome type 1 |

Publikationen in referierten Fachzeitschriften

1. Wintergerst L, Selmansberger M, Maihoefer C, Schüttrumpf L, Walch A, **Wilke C**, Pitea A, Woischke C, Baumeister P, Kirchner T, Belka C, Ganswindt U, Zitzelsberger H, Unger K, Hess J. A prognostic mRNA expression signature of four 16q24.3 genes in radio(chemo)therapy-treated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Mol Oncol** 2018;12(12):2085-101.
2. **Wilke CM[†]**, Braselmann H[†], Hess J, Klymenko SV, Chumak VV, Zakhartseva LM, Bakhanova EV, Walch, AK, Selmansberger M, Samaga D, Weber P, Schneider L, Fend F, Bösmüller HC, Zitzelsberger H, Unger K. A genomic copy number signature predicts radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. **Int J Cancer** 2018;143(6):1505-15.
3. Chumak VV, Klymenko SV, Zitzelsberger H, **Wilke C**, Rybchenko LA, Bakhanova EV. Doses of Ukrainian female clean-up workers with diagnosed breast cancer. **Radiat Environ Biophys** 2018;57(2):163-68.
4. **Wilke CM**, Hess J, Klymenko SV, Chumak VV, Zakhartseva LM, Bakhanova EV, Feuchtinger A, Walch AK, Selmansberger M, Braselmann H, Schneider L, Pitea A, Steinhilber J, Fend F, Bösmüller HC, Zitzelsberger H, Unger K. Expression of miRNA-26b-5p and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. **Int J Cancer** 2018;142(3):573-83.
5. Penterling C, Drexler GA, Bohland C, Stamp R, **Wilke C**, Braselmann H, Caldwell RB, Reindl J, Girst S, Greubel C, Siebenwirth C, Mansour WY, Borgmann K, Dollinger G, Unger K, Friedl A. Depletion of Histone Demethylase Jarid1A resulting in Histone hyperacetylation and radiation sensitivity does not affect DNA double strand break repair. **PLoS One** 2016;11(6):e0156599.

6. Javaher P, Stuhrmann M, **Wilke C**, Frenzel E, Manukjan G, Grosshenig A, Dechend F, Schwaab E, Schmidtke J, Schubert S. Should TSPYL mutation screening be included in routine diagnostics of male idiopathic infertility? **Fertil Steril** 2012;97(2):402-6.

Präsentationen

1. Identification of markers and deregulated networks in radiation-associated breast cancer **GBS (Gesellschaft für biologische Strahlenforschung)** – **jährliche Konferenz**. September 2016, Erlangen, Deutschland (Posterpräsentation)

2. Identification of markers and deregulated networks in radiation-associated breast cancer **GBS (Gesellschaft für biologische Strahlenforschung)** – **jährliche Konferenz**. Oktober 2015, Dresden, Deutschland (Vortrag)

3. Comparative global characterisation of microRNA-expression in radiation-associated and sporadic breast carcinomas **AEK (Abteilung experimentelle Krebsforschung)** – **jährliche Konferenz**. März 2015, Heidelberg, Deutschland (Posterpräsentation)

4. Comparative global characterisation of microRNA-expression in radiation-associated and sporadic breast carcinomas **EACR (European Association for Cancer Research)** – **jährliche Konferenz**. Juli 2014, München, Deutschland (Posterpräsentation)

5. Comparative global characterisation of microRNA-expression in radiation-associated and sporadic breast carcinomas **ISCO (International Society of cellular oncology)** – **jährliche Konferenz**. Mai 2014, Malaga, Spanien (Posterpräsentation)

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Mammakarzinome, welche nach dem Reaktorunfall in Tschernobyl entstanden sind, auf strahlenassoziierte molekulare Veränderungen hin untersucht. Dabei konnten hsa-miR-26b-5p und dessen Zielprotein *trichorhinophalangeal syndrome type 1* (TRPS1) als strahlenspezifische Marker nachgewiesen werden. Zudem erfolgte eine funktionelle Charakterisierung von *TRPS1* in strahlentransformierten Brustzellen. Des Weiteren wurden strahlenassoziierte und sporadische Mammakarzinome auf genomicscher Ebene mittels *Array Comparative Genomic Hybridization* (Array-CGH) charakterisiert. Es wurde eine genomische Kopienzahl-Signatur, die aus chromosomalen Kopienzahlveränderungen besteht, nachgewiesen. Diese Signatur ermöglicht den Expositionsstatus einer Patientin vorherzusagen. Die Ergebnisse konnten in drei Veröffentlichungen in *peer-reviewed* Journals publiziert werden und stellen die Grundlage für diese kumulative Doktorarbeit dar.

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Histologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit mit jährlich ca. 1.700.000 Neuerkrankungen und 522.000 Todesfällen. Bis 2050 wird ein drastischer Anstieg der weltweiten Inzidenzrate auf ca. 3.200.000 Neuerkrankungen pro Jahr erwartet.¹

Mammakarzinome lassen sich histopathologisch in invasive und nicht invasive Karzinome unterteilen. Die Tumorzellen des nicht invasiven Karzinoms haben die Basalmembran noch nicht durchbrochen und sind auf das Ursprungsgewebe begrenzt. Beim invasiven Karzinom haben die Tumorzellen bereits das umgebende Gewebe infiltriert.² Invasive Mammakarzinome vom nicht speziellen Typ (NST) sind mit einem

Anteil von etwa 70-80% die am häufigsten diagnostizierten sporadischen Mammakarzinome, gefolgt vom invasiv lobulären Mammakarzinom (ILC) mit einem Anteil von etwa 15% aller Mammakarzinome³⁻⁵. Das NST, in der früheren Nomenklatur als invasiv duktales Karzinom (IDC) bezeichnet, bildet sich in den meisten Fällen aus einer Präkanzerose (duktales Karzinom *in situ*) und hat seinen Ursprung in den Milchgängen der Brust^{2,3}. Routinemäßig wird das NST anhand immunhistochemischer Analysen in vier Subtypen unterteilt, die sich in ihrem Therapieansprechen und klinischen Verlauf unterscheiden: Luminal A, Luminal B, Her2-positiv und Triple-negativ^{4,6}. Die Klassifizierung erfolgt basierend auf dem Östrogen-, Progesteron-, Her2-Status und der Expression des Proliferationsmarkers Ki67. Die Bestimmung der Subtypen hat therapeutische Relevanz für die Indikation einer systemischen Chemotherapie.^{2,6} Das ILC hingegen wächst ausgehend von den Drüsenlappen der Brust, zeichnet sich häufig durch ein niedriges histologisches Grading aus und hat in den meisten Fällen eine gute Prognose^{2,5}. Neben den bereits genannten Tumortypen existieren noch weitere seltene Brustkrebs-Formen, z.B. muzinöse, medulläre, invasiv papilläre und invasiv tubuläre Subtypen³.

1.1.2 Risikofaktoren

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine heterogene Erkrankung, die in den meisten Fällen sporadischen Ursprungs ist und ohne familiäre Häufung auftritt⁷. Die Entstehung des Karzinoms ist multifaktoriell bedingt, da es auf Grund einer Interaktion zwischen Lebensstil und genetischer Suszeptibilität hervorgerufen wird. Zu den Hauprisikofaktoren an einem Mammakarzinom zu erkranken, gehören neben dem Alter der Frau auch hormonelle Einflüsse. Eine frühe Menarche, ein später Eintritt in die Menopause, eine Nulliparität, eine späte Erstparität und eine kurze Stillperiode erhöhen das Risiko an einem Brustkrebs zu erkranken.⁸ Des Weiteren erhöht eine Hormonersatztherapie mittels Östrogen-Gestagen-Therapie in den Wechseljahren das relative Risiko ein Mammakarzinom zu entwickeln⁹. Ebenfalls wird durch die lang-

fristige Einnahme von oralen Kontrazeptiva das relative Brustkrebsrisiko erhöht¹⁰. Neben den erwähnten hormonellen Risikofaktoren sind noch weitere Prädispositionen- und Risikofaktoren zu nennen. Unter anderem lassen eine erhöhte Gewebsdichte, vorangegangene benigne Erkrankungen der Brust, ein hoher *insulin-like growth factor* 1 (IGF1)- Spiegel, ein erhöhter Alkoholkonsum, Übergewicht bei postmenopausalen Frauen und Zigarettenkonsum das Brustkrebsrisiko ebenfalls ansteigen^{8, 11}. Zudem sind Frauen aus Nordeuropa und Nordamerika weitaus häufiger von der Erkrankung betroffen als Frauen aus dem ostasiatischen Raum, Südamerika und Afrika. Die große Varianz der Brustkrebsinzidenz in verschiedenen Regionen der Welt kann genetischen Unterschieden zwischen Populationen sowie verschiedenen Lebensstilen in den einzelnen Regionen zugeschrieben werden.⁸

Etwa 10% aller Mammakarzinome sind genetischen Ursprungs¹². Am häufigsten sind Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *breast cancer gene 1 (BRCA1)* und *breast cancer gene 2 (BRCA2)* zu finden. Diese sind für etwa 50% aller vererbten Mammakarzinome verantwortlich.¹³ Weitere Genveränderungen, die das Brustkrebsrisiko erhöhen, betreffen unter anderem Mutationen von *PALB2*, *p53* (Li-Fraumeni-Syndrom), *PTEN* (Cowden-Syndrom), *STK11* (Peutz-Jeghers-Syndrom) sowie *CDH1*, *CHEK2*, *ATM*, *MRE11*, *RAD50*, *NBS1*, *BRIP1*, *FANCA*, *FANCC*, *FANCM*, *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* und *XRCC2* ^{14, 15}.

Neben den bereits erwähnten Risikofaktoren hat eine erhöhte Exposition mit ionisierender Strahlung z.B. im Rahmen von medizinischer Diagnostik- und Therapieverfahren sowie nukleärer Unfälle eine große Bedeutung bei der Karzinogenese des Brustgewebes. Ionisierende Strahlung gibt Energie an Zellen ab und kann dadurch Läsionen wie z.B. Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Doppelstrangbrüche hervorrufen, die im Prozess der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielen¹⁶. Die weibliche Brust zählt neben der kindlichen Schilddrüse und dem Knochenmark zu einem der strahlenempfindlichsten Organe¹⁷. Vor allem zeigen junge Frauen, die zum Zeitpunkt der Exposition jünger als 20 Jahre alt sind, ein erhöhtes Risiko einen strahleninduzierten Brustkrebs zu entwickeln. Während der Entwicklung im Uterus, der Pubertät und der

Schwangerschaft findet in den Brustdrüsen eine vermehrte Zellproliferation statt. Während dieser Phasen der vermehrten Zellproliferation haben die Zellen der Brust ein erhöhtes Risiko zu entarten, da proliferierendes Gewebe eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit zeigt. Frauen, die sich bereits in der Menopause befinden haben dagegen ein geringeres Risiko einen strahleninduzierten Brustkrebs zu entwickeln. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch durch vorangegangene benigne Brusterkrankungen das Risiko für die Entstehung eines strahleninduzierten Mammakarzinoms beeinflusst wird.¹⁸ Darüber hinaus reagieren Frauen die Trägerin einer *BRCA1/2*-Mutation sind, sensitiver auf die schädlichen Effekte ionisierender Strahlung. Dies ist zurückzuführen auf die Beeinträchtigung in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.¹⁹

Epidemiologische Studien legen nahe, dass eine Exposition mit ionisierender Strahlung erhöhte Tumorraten in der Brust bewirkt. Dabei kommen die Erkenntnisse aus Studien, welche die Auswirkungen der Exposition mit ionisierender Strahlung im Rahmen von medizinischer Diagnostik- und Therapieverfahren, nukleären Unfällen und den Atombombenabwürfen in Japan beschreiben. Die Life Span Study, eine epidemiologische Kohortenstudie an ca. 120.000 Atombombenüberlebenden, zeigte einen signifikanten Anstieg der Krebsrate, insbesondere des Magens, des Darms, des Ovarials, der Mundhöhle, der Speiseröhre, der Harnblase, der Schilddrüse, der Brust, der Leber, der Lunge, der Haut, des Nervensystems und der lymphatischen Systeme, bei den Überlebenden der Atombombenabwürfe^{20, 21}. Personen, die im Kindesalter exponiert wurden zeigten dabei ein höheres Risiko für strahleninduzierten Krebs als diejenigen, die im höheren Alter exponiert wurden²². In diesem Zusammenhang zeigte eine Studie an Überlebenden der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki einen dosisabhängigen Anstieg der Brustkrebsrate nach Exposition mit ionisierender Strahlung. Dieser Anstieg konnte besonders bei jüngeren Frauen, welche sich zum Zeitpunkt der Exposition noch in der Entwicklung befanden und das 20. Lebensjahr noch nicht erreicht hatten, beobachtet werden.²³ Eine erhöhte Rate der Brustkrebsinzidenz konnte auch nach Strahlenexposition im Rahmen medizinischer Thera-

pie- und Diagnostikverfahren gezeigt werden. Unter anderem zeigten epidemiologische Studien an Patientenkollektiven aus Schweden und Frankreich, dass Patienten, welche während der frühen Kindheit zur Behandlung eines Hämangioms insbesondere mit ²²⁶Radium (Ra) bestrahlt wurden, ein erhöhtes Risiko für ein strahleninduziertes Karzinom sowie für eine krebsbedingte Mortalität haben²⁴⁻²⁶. Studien am schwedischen Hämangioma-Kollektiv, bestehend aus ca. 17.000 Kindern, zeigten einen linearen dosisabhängigen Anstieg des Brustkrebsrisikos. Das Risiko nahm mit zunehmenden Alter der Exposition ab und blieb bis zu 50 Jahre nach der Bestrahlung bestehen.^{27, 28} Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Strahlentherapie zur Behandlung einer postpartalen Mastitis sowie eines vergrößerten Thymus in jungen Jahren das Brustkrebsrisiko erhöht²⁹. Zudem wiesen Patientinnen, welche zur Behandlung eines Non-Hodgkin Lymphoms im Kindes- und Jugendalter eine Radiotherapie erhielten, ein erhöhtes Risiko auf einen Brustkrebs als Sekundärtumor zu entwickeln³⁰. Auch nach diagnostischer Strahlenexposition konnte bereits eine erhöhte Brustkrebsrate beobachtet werden: Frauen die zur Behandlung einer Tuberkulose oder Skoliose regelmäßig eine Röntgen-Fluoroskopie erhielten, zeigten ebenfalls ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms^{31, 32}. Immer wieder diskutiert wird die Exposition mit ionisierender Strahlung im Rahmen von Mammographie-Untersuchungen. In Relation zum potentiellen Nutzen des Untersuchungsverfahrens (Früherkennung von Mammakarzinomen), wird das kanzerogene Risiko nach wiederholten Mammographien (ca. 1,5-2 Millisievert (mSv) Dosisbelastung pro Mammographie) als gering eingestuft, wenn ein bestimmtes Lebensalter überschritten ist (Mammographie-Screening für Frauen zwischen 50 und 74 Jahren). Jedoch wird Trägerinnen einer risikoerhöhenden genetischen Variante, z.B. einer *BRCA1/2*-Mutation oder einer erblich bedingten Disposition für Brustkrebs, empfohlen, auf einen Ultraschall bzw. eine Magnetresonanztomographie zurückzugreifen.³³

Weitere Studien beschäftigten sich mit Personen, die der ionisierenden Strahlung der Nuklearkatastrophe von Tschernobyl ausgesetzt waren, der größte nukleäre Unfall der Geschichte, welcher sich am 26.04.1986 in der früheren Sowjetunion ereignete³⁴.

An diesem Tag explodierte der Reaktorblock 4 des Kernkraftwerks von Tschernobyl nahe der ukrainischen Stadt Prypiat beim Versuch einen Ausfall der externen Stromversorgung zu simulieren. Als Folge der Explosion des Reaktorblockes gelangte radioaktives Material in die Erdatmosphäre. Die radioaktive Wolke breitete sich über die gesamte nördliche Halbkugel aus und setzte insgesamt eine Aktivität von mehreren Trillionen Bequerel frei. Darunter waren ca. 1.76×10^{18} Becquerel Iod (I)-131, 0.085×10^{18} Becquerel Caesium (Cs)-137 und weitere kurzlebige Iodisotope. Gebiete im Norden der Ukraine sowie die ehemaligen Sowjetrepubliken Weißrussland und Russland wurden dabei am stärksten mit radioaktivem Material kontaminiert.³⁵ Mehr als 2.000.000 Personen waren von der Reaktorkatastrophe betroffen. Davon waren ca. 200.000 registrierte Liquidatoren, welche aus der Ukraine, Russland und Weißrussland stammten. Die Liquidatoren wurden direkt nach der Katastrophe für die Verrichtung von Aufräumarbeiten und die medizinische Versorgung am Unglücksort eingesetzt.³⁶ Im Schnitt wurden die Liquidatoren mit einer Strahlendosis von etwa 90 Milligray (mGy) exponiert^{36, 37}. Neben den Liquidatoren waren auch Arbeiter des Kernkraftwerkes und große Teile der Bevölkerung der ionisierenden Strahlung ausgesetzt. Etwa 90.000 Personen wurden von 1986 bis 1990 evakuiert und umgesiedelt³⁷. Es gibt bereits eine Reihe von epidemiologischen Studien über die gesundheitlichen Konsequenzen des Reaktorunfalls. Die bislang am besten charakterisierte Gesundheitsfolge des Unglücks ist ein eindeutiger Anstieg in der Rate von Schilddrüsenkarzinomen im Kindesalter³⁴. Zudem konnten epidemiologische Studien von Prysiaznyuk et al. und Pukkala et al. einen Anstieg der Brustkrebsrate nachweisen. Prysiaznyuk et al. zeigten, dass Liquidatorinnen aus der Ukraine im nationalen Vergleich einen signifikanten Anstieg der Brustkrebsrate aufwiesen^{38, 39}. Bewohnerinnen hoch kontaminiertener Regionen in Weißrussland und der Ukraine zeigten ebenfalls eine erhöhte Brustkrebsrate, besonders junge Frauen⁴⁰.

1.1.3 Mammakarzinom Kollektiv von Liquidatorinnen und Dosimetrie

Um an den von Prysyazhnyuk et al. und Pukkala et al. publizierten Daten anzuknüpfen, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit in Kooperation mit Wissenschaftlern in der Ukraine zum ersten Mal ein Kollektiv, bestehend aus Brustkrebsgewebeproben von Liquidatorinnen und Bewohnerinnen kontaminiertes Gebiete der Ukraine, erstellt und analysiert. Neben epidemiologischen Daten und Dosisdaten konnten zum ersten Mal auch Gewebeproben der exponierten Brustkrebspatientinnen gewonnen werden. Zur Etablierung des Kollektivs der Liquidatorinnen und der Bewohnerinnen kontaminiertes Gebiete wurden Brustkrebsfälle des staatlichen Tschernobyl Registers aus den Kliniken von Kiev, Sumy, Chernihiv, Cherkassy, Zchitomyr, Bilaja, Cerkov, Rivno und Donetsk mit dem nationalen Krebsregister der Ukraine abgeglichen und Fälle in das Kollektiv eingeschlossen, von denen Gewebeproben sowie klinische Daten vorhanden waren. Auf der Grundlage des Kollektivs von bestrahlten Patientinnen wurde das Kontrollkollektiv aus dem nationalen Krebsregister der Ukraine ausgewählt und hinsichtlich Alter, Tumortyp, Residenz (Ukraine), histologischem Grading und TNM-Klassifizierung an das bestrahlte Patientenkollektiv angeglichen. Ein Limitationsfaktor, welcher die Zusammenstellung der Kollektive erschwert, ist das Alter. Da mit zunehmendem Alter das Risiko für die Entstehung eines sporadischen Mammakarzinoms stetig ansteigt, wurde darauf abgezielt, möglichst junge Patientinnen in die Kollektive zur Erforschung der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese einzuschließen. Dieser Limitationsfaktor begrenzt die Kollektivgröße. Ein weiterer Limitationsfaktor bei der Erforschung der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese ist die Dosimetrie. In den meisten Fällen liegen keine direkten Dosisdaten für die strahlenexponierten Populationen vor. Folglich bedient man sich der indirekten Dosisabschätzung, welche große Unsicherheiten mit sich trägt. Die Dosis mit der die bestrahlte Patientengruppe exponiert wurde, konnte mit der *Realistic Analytical Dose Reconstruction with Uncertainty Estimation* (RADRUE)-Methode bestimmt werden. Diese wurde von Experten der internationalen Dosimetriegruppe aus der Ukraine, Russland, Frankreich, USA, Litauen und Weißrussland entwickelt. Die RADRUE-Methode rekonstruiert die

individuellen Dosen, mit der die Liquidatorinnen exponiert wurden, basierend auf Daten von persönlichen Interviews, welche von erfahrenen Dosimetristen durchgeführt wurden. Zur genauen Dosisrekonstruktion wurden Informationen zur physikalischen Aktivitätsmessung in der Umwelt und regionalen Strahlenkontamination herangezogen.⁴¹⁻⁴³ Mit Hilfe dieser Informationen lässt sich die externe Dosis als ein Produkt aus Expositionsrate und Bestrahlungszeit errechnen⁴⁴. Die Dosen, die mit der RADRUE Methode rekonstruiert wurden, sind mit einer relativ hohen Unsicherheit behaftet. Diese lässt sich in zwei Kategorien unterteilen, die als „intrinsische“ und „menschliche“ Unsicherheiten bezeichnet werden. Die „intrinsische“ Kategorie setzt sich aus Unsicherheiten in Bezug auf Expositionsdaten, zeitliche und räumliche Interpolation der Daten sowie Ungenauigkeiten aus den Fragebögen zusammen. Die „menschlichen“ Unsicherheiten resultieren aus Fehlern bei der Beantwortung von Fragen des Interviewformulars.⁴⁵ Dennoch ist es gelungen mit Hilfe der RADRUE Methode die Dosen für ein Brustkrebs Kollektiv von Liquidatorinnen und Bewohnerinnen kontaminiert Gebiete der Ukraine, zu rekonstruieren. Die Ergebnisse der Dosisabschätzung führten zu einer Publikation (Chumak et al., 2018), die Teil dieser kumulativen Dissertation ist⁴⁶.

1.1.4 Molekulare Subtypen und Biomarker

In der Routinediagnostik werden Mammakarzinome zunächst histopathologisch anhand des TNM-Status klassifiziert, welcher Tumore nach ihrer Größe und anatomischen Ausbreitung beschreibt. Dieser setzt sich aus den nachfolgend genannten drei Komponenten zusammen: T (Ausbreitung des Primärtumors), N (regionäre Lymphknotenmetastasen) und M (Fernmetastasen). Zudem werden die Tumore mit dem histologischen Grading, welches den histopathologischen Differenzierungsgrad des Tumorgewebes angibt, beschrieben.² Neben der TNM-Klassifikation, dem histologischen Grading, ist die Identifizierung von Biomarkern ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer individualisierten Behandlung von Mammakarzinomen. Wie bereits un-

ter 1.1.1 erwähnt, werden Mammakarzinome (NST) basierend auf tumorbiologischen Parametern (Östrogen-, Progesteron-, Her2-Status und Ki67-Expression), welche anhand immunhistochemischer Analysen bestimmt werden, in die vier Subtypen luminal A, luminal B, Her2-positiv und Triple-negativ unterteilt. Anhand von Genexpressionsprofilen lassen sich diese molekularen (intrinsischen) Subtypen (luminal A, luminal B, Her2-positiv, *basal-like*) sowie weitere Gruppen (*normal-like* und *claudin-low*) ebenfalls ableiten.^{4, 6} Anhand der Genexpressionsprofile war es möglich, die tumorbiologischen Eigenschaften der molekularen Subtypen weiter zu entschlüsseln und die Patienten in Risikogruppen einzuteilen, was für die individuelle Therapiewahl wichtig ist⁴⁷⁻⁴⁹. Folglich wurden für die klinische Diagnostik kommerziell verfügbare Genexpressionstests (wie z.B. der PAM50 Test) entwickelt. Diese ermöglichen den Nachweis der molekularen Subtypen und geben gleichzeitig Auskunft über den weiteren Krankheitsverlauf des Patienten und das Therapieansprechen (z.B. auf eine Chemotherapie)⁵⁰. Der luminaire Subtyp des Mammakarzinoms zeichnet sich durch einen positiven Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus aus und hat eine relativ gute Prognose. Typ B (luminal B) ist im Gegensatz zu Typ A (luminal A) für das zellzyklusspezifische Antigen *Ki67* positiv. Der *normal-like* Tumor ist wie der luminal A Tumor Hormonrezeptor-positiv sowie *Ki67*-negativ und ist gekennzeichnet durch eine normale Brustgewebsproliferation. Der Her2-positiv-klassifizierte molekulare Subtyp zeichnet sich durch einen positiven *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2/neu)-Rezeptorstatus aus. Der *basal-like* Tumor ist wie der Triple-negative Tumor Hormonrezeptor-negativ sowie Her2-negativ. Die Patienten haben eine signifikant schlechtere Überlebensrate.^{6, 51} Die Mehrheit der *claudin-low* Tumore ist ebenfalls Hormonrezeptor-negativ sowie Her2-negativ. Zudem zeichnen sie sich durch eine geringe bis fehlende Expression von luminalen Differenzierungsmarkern, eine hohe Anreicherung für epitheliale bis mesenchymale Übergangsmarker, Immunantwortgene und krebsstammzellartige Merkmale aus. Sie zeigen eine niedrige Genexpression von *Claudin 3*, *4* und *7* sowie *E-Cadherin*.⁵² Zentrale prädiktive und prognostische Marker des Mammakarzinoms sind die Östrogen- und Progesteronrezeptoren, welche als tran-

skriptionelle Regulatoren den Hormonhaushalt regeln⁵³. Die Überexpression der Hormonrezeptoren, insbesondere von ER α , korreliert mit einer günstigen Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf des Patienten^{54, 55}. Durch die Hormonrezeptoren werden viele Gene reguliert, die bei der Angiogenese, Zellproliferation, Apoptose und Metastasierung eine Rolle spielen⁵⁶. Bei Hormonrezeptor-positiven Patienten wird die adjuvante endokrine Therapie mit herangezogen. Es werden Anti-Östrogene, Aromatasehemmer und Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH)-Analoga eingesetzt, um die hormonabhängige Proliferation der Tumorzellen zu unterbinden. Dabei wird oft der selektive Östrogen-Rezeptor-Modulator Tamoxifen eingesetzt. Die Wirkungsweise von Tamoxifen beruht auf der kompetitiven Hemmung der Östrogenrezeptoren.² Der Wirkmechanismus der Aromatasehemmer besteht darin, das Enzym Aromatase, welches die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen bewirkt, zu inhibieren⁵⁷. Die dritte Medikamentengruppe, welche zur antihormonalen Therapie eingesetzt wird, sind die GnRH-Analoga. Diese binden an die GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse, wodurch es langfristig zu einer verminderten Freisetzung der Sexualhormone FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) kommt. Als Folge davon sinkt der Östrogenspiegel.² Ein weiterer relevanter Biomarker für die Therapie des Mammakarzinoms ist der (Her2/neu)-Rezeptor. Etwa 15-20% aller Mammakarzinome zeigen eine Überexpression des Her2/neu-Rezeptors⁵⁸. Die Überexpression des Proto-Onkogens *Her2/neu*, welcher zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren gehört, korreliert mit einer schlechteren Überlebensrate der Patienten. Durch die Überexpression des Her2-Rezeptors kommt es zur Inhibition der Apoptose über den mTOR-Signalweg und zur Stimulation der Zellproliferation über den RAS-MAP Kinase-Weg.⁵⁹ Zur Behandlung wird bei Her2-positiven Patienten der humanisierte Antikörper Trastuzumab erfolgreich eingesetzt. Trastuzumab bindet an die extrazelluläre Domäne des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors Her2/neu. Infolgedessen wird die Proliferation der Tumorzellen gehemmt und die Apoptoserate der transformierenden Zellen steigt deutlich an.^{59, 60} Zudem wird durch Trastuzumab eine Expression von anti-angiogenen Faktoren sowie eine Antikörper-abhängige Zer-

störung von Tumorzellen durch das Immunsystem (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) ausgelöst^{61, 62}. Ein weiterer klassischer Biomarker des Mammakarzinoms ist das zellzykluspezifische Antigen *Ki67*, welches in die Zellzyklusproliferation involviert ist und folglich Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten des Tumors zulässt^{63, 64}. Ein weiteres Onkogen, das in der Mammakarzinogenese eine wichtige Rolle spielt, ist *c-myc*. Dessen Expressionsstatus wird in der Mammakarzinomdiagnostik oft bestimmt und korreliert mit einem schlechteren Überleben^{65, 66}. Einige dieser bereits etablierten Biomarker spielen auch eine Rolle bei der strahleninduzierten Mammakarzinogenese. Studien an Überlebenden der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki zeigten eine Assoziation der *c-myc*- und *Her2/neu*-Amplifikation mit der Strahlenexposition⁶⁷. Des Weiteren konnte eine Assoziation zwischen genetischer Instabilität und einem höheren histologischen Grading in den strahlenexponierten Fällen gezeigt werden^{67, 68}. Studien an Brustkrebsgeweben von Frauen, die zuvor unter anderem zur Behandlung eines Non-Hodgkin Lymphoms therapeutisch bestrahlt wurden, zeigten teils kontroverse Ergebnisse. Einige Studien zeigten eine höhere Rate an Hormonrezeptor- und *Her2*-negativen Mammakarzinomen in bestrahlten Frauen, wohingegen andere eine höhere Rate der *Her2*-Amplifikation nachweisen konnten⁶⁹⁻⁷¹. Zudem zeigten Brustkrebszellen von bestrahlten Frauen eine erhöhte Proliferationsrate, gemessen am *Ki67*-Marker^{70, 71}. Insgesamt sind die bisher vorliegenden Daten zu Mammakarzinomen von exponierten Frauen teilweise widersprüchlich und beziehen sich weitgehend auf bekannte Brustkrebsgene. Anknüpfend an diese Erkenntnisse ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit zu analysieren, ob es weitere Marker gibt, die speziell bei der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese eine Rolle spielen und geeignet sind, sporadischen Brustkrebs von strahlenassoziiertem Brustkrebs zu unterscheiden. In strahlenassoziierten Schilddrüsentumoren konnte bereits ein persistenter Marker (CLIP2) nachgewiesen werden, welcher noch lange Zeit nach der Strahlenexposition gemessen und erfasst werden kann⁷². Neben persistenten Biomarkern gibt es auch Biomarker der Exposition. Diese sind bereits kurz nach der Strahlenexposition messbar und im späteren Verlauf

kaum mehr nachzuweisen. Biomarker der Suszeptibilität können vor, während oder nach der Exposition erfasst werden und ein erhöhtes Risiko für strahleninduzierte Auswirkungen auf die Gesundheit vorhersagen. Biomarker von Spätfolgen der Exposition sind erst nach einer gewissen Latenzzeit detektierbar.⁷³ Ein geeigneter Strahlenbiomarker sollte sensitiv und spezifisch sein und auf Kollektive mit großen Fallzahlen anwendbar sein⁷⁴. Ziel ist es, die Strahlenmarker funktionell zu charakterisieren, um sie in mechanistische Modelle der Karzinogenese zu integrieren. Mit Hilfe des CLIP2-Markers ist dies bereits in strahlenassoziierten Schilddrüsentumoren gelungen. Mit Hilfe des Markers kann ein strahleninduzierter Fall erkannt werden und somit die Kausalität der Tumorentstehung nachgewiesen werden⁷². Somit war die Etablierung von Strahlenmarkern in Mammakarzinomen und dessen funktionelle Charakterisierung mittels Netzwerk-Rekonstruktion ein wichtiger Aspekt dieser Doktorarbeit.

1.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt, um verbesserte und gezieltere Therapien gegen Krebs zu entwickeln. Sie besitzen das Potential als Biomarker in der Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen zu fungieren^{75, 76}. MiRNAs sind nicht kodierende, hoch konservierte RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden, welche die Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene steuern⁷⁷⁻⁷⁹. Bereits 1993 wurde die erste miRNA lin-4 im Nematoden *Caenorhabditis elegans* identifiziert⁸⁰. In den letzten Jahren wurden viele weitere miRNAs entdeckt, so dass bis heute über 2500 humane miRNAs in der Datenbank *miRBase* (Release 21.0) gelistet sind⁸¹. Die Expression von über 60% aller humanen Gene wird von miRNAs reguliert⁸². Die Biogenese der miRNAs gliedert sich in zwei Schritte. Die für die miRNAs codierenden Sequenzen befinden sich in der genomischen DNA und werden zunächst von der RNA-Polymerase II oder III zum Primärtranskript der *primary precursor* miRNA (pri-miRNA) transkribiert. Diese faltet sich zu

einer Schleife zusammen. Anschließend wird im Zellkern die pri-miRNA vom RNase III-Enzym Drosha endonukleolytisch in die *precursor* (pre-miRNA) gespalten. Die pre-miRNA weist eine charakteristische Haarnadelstruktur (*hairpin*) auf und ist ca. 60-70 Nukleotide lang. Die pre-miRNA wird mittels Exportin-5 in das Cytoplasma exportiert. Dort wird mittels des RNase III-Enzyms Dicer die Haarnadelstruktur entfernt. Dadurch entsteht die ca. 22 Nukleotide lange, einzelsträngige miRNA. Diese wird anschließend an den *RNA-induced silencing complex* (RISC)-Komplex, dessen Hauptkomponente Argonaute (AGO)-Proteine darstellen, transportiert, der wiederum an komplementäre Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region der *messenger RNA* (mRNA) von Ziel-genen bindet.^{83, 84} Dabei kann eine mRNA Bindesequenzen für mehrere miRNAs be-sitzen oder auch eine miRNA die Expression mehrerer Ziel-mRNAs steuern. Abhängig vom Grad der Komplementarität der Bindesequenzen kommt es zur Inhibition der Translation (partielle Komplementarität) oder zur Degradation der mRNA (perfekte Basenpaarung)⁸⁵. Um den Einfluss von miRNAs auf die komplexen molekularen Netzwerke der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese zu entschlüsseln, ist es wichtig, die Ziel-mRNAs und deren funktionale Netzwerke zu analysieren. Dafür stehen Zell-kulturmodelle zur Verfügung, in denen Gene hoch- bzw. herunterreguliert werden können, und anschließend der Einfluss auf das Transkriptom mit Hilfe von *mRNA-microarrays* gemessen werden kann. Dass miRNAs eine Rolle bei der Karzinogenese spielen, konnte erstmals 2002 von Calin et al. gezeigt werden. Calin et al. zeigten, dass die chromosomal Region 13q14, in der hsa-miR-16-1 und hsa-miR-15a lokali-siert sind, in über 65% aller Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie deletiert ist⁸⁶. Daran anknüpfend zeigten in den folgenden Jahren eine Reihe von Studien glo-bale Deregulationen von miRNAs in Tumoren⁸⁷. In diesem Kontext steuern miRNAs zellproliferierende und apoptotische Prozesse der Karzinogenese, indem sie als On-kogen oder Tumorsuppressor fungieren⁸⁸. Des Weiteren konnte bereits mit Hilfe von miRNA-Expressionsanalysen die Untergliederung des Mammakarzinoms in den lumi-nalen und basalen molekularen Subtyp des sporadischen Mammakarzinoms vorge-nommen werden. Hinsichtlich weiterer klinischer Faktoren (z.B. Östrogenrezeptor-,

Progesteronrezeptor-, T- und N-Status), welche in der Mammakarzinogenese eine zentrale Rolle spielen, zeigen miRNA-Profile unterschiedliche Expressionsmuster. Diese können zur Tumor-Diagnostik sowie Klassifizierung genutzt werden.^{79, 89} Die Expression von miRNAs wird durch Stressfaktoren wie Hypoxie, Nährstoffmangel, Krankheiten und ionisierende Strahlung verändert^{90, 91}. Dass durch ionisierende Strahlung eine Veränderung in der Expression von miRNAs ausgelöst wird, konnte bereits an bestrahlten Brust(krebs)zelllinien gezeigt werden⁹²⁻⁹⁴. Stankevicens et al. fanden eine Hochregulation von hsa-miR-34a nach Röntgenbestrahlung in p53-positiven Brustzellen (MCF-10A) und Brustkrebszellen (MCF7) im Vergleich zu p53-negativen Brustkrebszellen (T-47D). Folglich wird hsa-miR-34a eine Beteiligung an den Prozessen der DNA-Schadensantwort zugeschrieben.⁹³ In diesem Zusammenhang wurde auch herausgefunden, dass p53 im Bezug auf die Schadensantwort die Expression von miRNAs beeinflusst und umgekehrt auch p53 von mehreren miRNAs reguliert wird⁹⁵. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass miRNAs mit einer Reihe von Genen, welche in der DNA-Schadensantwort eine Rolle spielen, interagieren und folglich das Potenzial haben, die Empfindlichkeit von Tumoren gegenüber strahlentherapeutischen Behandlungen zu beeinflussen. Des Weiteren konnte bereits nach Strahlentherapie im Rahmen einer Brustkrebstherapie eine veränderte Expression von miRNAs im Serum gemessen werden.^{92, 96, 97} Dies macht miRNAs zu geeigneten Markern für die Diagnostik und Therapie. Anknüpfend daran war ein Ziel dieser Arbeit zu analysieren, ob miRNAs und deren Zielproteine auch eine Rolle in strahlenassoziierten Mammakarzinomen von Frauen, die als Folge der Tschernobyl-Reaktorkatastrophe mit ionisierender Strahlung im niedrigen Dosisbereich exponiert wurden, spielen. Diese könnten folglich für die Diagnostik von strahlenassoziiertem Brustkrebs eingesetzt werden und zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese beitragen. Diese Analyse führte zu einer Publikation (Wilke et al., 2018), die Teil dieser kumulativen Doktorarbeit ist⁹⁸.

1.3 Genomische Kopienzahlveränderungen

Wie bereits erwähnt, haben Studien an Überlebenden der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki eine Assoziation mit typischen Brustkrebsmarkern (c-myc und Her2/neu-Amplifikation) gezeigt⁶⁷. Des Weiteren konnte auch eine Assoziation mit genetischer Instabilität und einem höheren Grading in den strahlenexponierten Fällen nachgewiesen werden^{67, 68}. Genetische Instabilität zeichnet sich durch vermehrtes Auftreten von Punktmutationen und anderen genetischen Veränderungen aus wie zum Beispiel Deletionen, Duplikationen, Amplifikationen, Inversionen, Insertionen und Translokationen⁹⁹. Eine Möglichkeit, genetische Instabilität genauer zu messen, ist, die Kopienzahl von DNA-Abschnitten zu untersuchen. Kopienzahlveränderungen der DNA sind DNA-Zugewinne oder DNA-Verluste von Regionen größer als 50 Basenpaaren¹⁰⁰. Diese Einzel- wie auch Doppelstrangbrüche in der DNA, werden typischerweise durch ionisierende Strahlung induziert¹⁰¹. Mit Hilfe der Array-CGH ist es möglich, Kopienzahlveränderungen in der DNA zu messen. Kopienzahlveränderungen sind für 85% der Varianz in der Genexpression verantwortlich und spielen im Prozess der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle¹⁰². Curtis et al. charakterisierten die Kopienzahlveränderungen und Genexpressionsprofile von etwa 2000 Mammakarzinomen und zeigten Assoziationen von Kopienzahlveränderungen mit entsprechend aberranten Genexpressionsprofilen¹⁰³. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Kopienzahlveränderungen die molekulare Pathogenese der Tumore bestimmen. Des Weiteren erfolgte anhand von Kopienzahl- und mRNA-Expressionsanalysen bereits eine Untergliederung in die unterschiedlichen molekularen Subtypen des sporadischen Mammakarzinoms (luminal, *basal-like* und Her2-positiv)¹⁰⁴. Mit der zunehmenden Generierung von hochdimensionalen Datensätzen durch Hochdurchsatzmethoden wie Array-CGH, mRNA- und miRNA-Expressionsarrays haben sich neue mathematische und bioinformatische Methoden für die Auswertung und Interpretation dieser Daten ergeben. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren zahlreiche mRNA- und miRNA-Signaturen aus Expressionsdaten in vielen Tumorentitäten entwickelt, welche mit prognostischen Parametern assoziiert

sind¹⁰⁵. Im sporadischen Mammakarzinom wurde bereits eine Genexpressions-Signatur gefunden, die Auskunft über das Überleben eines Patienten geben kann¹⁰⁶. Genexpressionstests wie z.B. der Mammaprint-Test, welcher die mRNA-Expression von 70 Genen analysiert, werden bereits für eine individuell optimierte Brustkrebs-therapie eingesetzt^{107, 108}. Der Mammaprint-Test gibt eine Auskunft über die Wirksamkeit einer adjuvanten Chemotherapie sowie eine Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf des Patienten^{6, 107}. Des Weiteren wurde eine Signatur auf miRNA-Ebene gefunden, welche den Hormonrezeptorstatus und den Her2/neu-Status bestimmen kann¹⁰⁹. Brustkrebs ist eine Erkrankung mit heterogenen biologischen und klinischen Merkmalen¹². Die Progression eines Tumors ist abhängig von der Aktivierung/Inaktivierung molekularer Signalwege, die ganze Gengruppen und nicht nur einzelne Genveränderungen umfassen. Aus diesem Grund wird anhand von Signaturen die genomische Komplexität dieser Karzinome besser abgebildet. In diesem Zusammenhang wurden bereits statistische Ansätze zur Modellierung einer Signatur basierend auf Kopienzahlaberrationen entwickelt. Anhand dieser Signaturen war es bereits möglich, die Abstammung von Individuen vorherzusagen oder histologische Subtypen von Endometriumkarzinomen zu klassifizieren^{110, 111}. Eine genomische Kopienzahl-Signatur für Mammakarzinome, für die Vorhersage eines klinischen Endpunkts oder einer vorausgegangenen Strahlenexposition des Patienten, gibt es bis heute jedoch noch nicht. Anknüpfend an diese Erkenntnisse war es ein Ziel dieser Arbeit, erstmals eine biostatistische Methode zur Generierung einer genomischen Kopienzahl-Signatur in strahlenassoziierten Mammakarzinomen zu entwickeln, welche die Vorhersage des Expositionsstatus erlaubt. Dies erfolgte mit Unterstützung mathematischer Expertise. Dieser Ansatz führte zu einer Veröffentlichung, die Teil dieser kumulativen Dissertation ist¹¹².

1.4 Ziele der Arbeit

Um die Auswirkungen ionisierender Strahlung auf den Menschen besser verstehen zu können, ist die Erforschung von Strahlenmarkern in den entstandenen Tumoren wichtig. Sie ermöglichen die individuelle Unterscheidung von sporadischen und strahlenassoziierten Karzinomen und können so zu einer verbesserten Risikoabschätzung einer Strahlenexposition beitragen. Die molekularen Mechanismen der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese sind bis heute weitestgehend unklar. Deshalb war das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit, durch die Charakterisierung strahlenspezifischer Veränderungen in Mammakarzinomen zu einem verbesserten Verständnis der molekularen Mechanismen beizutragen. Dabei sollten die Expression von ausgewählten miRNAs und deren Zielgenen/Zielproteinen sowie genomische Kopienzahlveränderungen untersucht werden. Hierfür sollten sowohl Experimente an Patientenmaterial als auch im Zellkulturmodell durchgeführt werden. Dazu sollten ein Untersuchungskollektiv und ein Validierungskollektiv sowohl von strahlenassoziierten Mammakarzinom-Geweben von Liquidatorinnen als auch von Bewohnerinnen kontaminieter Regionen des Tschernobyl-Unfalls untersucht werden. Zudem sollte ein hinsichtlich des Alters, Tumortyps, Residenz (Ukraine), histologischem Grading und TNM-Klassifizierung an das bestrahlte Patientenkollektiv angeglichenes Kontrollkollektiv ohne Strahlenvorgeschichte analysiert werden. Die Expression ausgewählter miRNAs sollte mittels *quantitativer real time reverse transcription PCR* (qRT-PCR) in den strahlenassoziierten und sporadischen Mammakarzinomen untersucht und auf Assoziation mit der Strahlenexposition getestet werden. Die dadurch identifizierten miRNA-Kandidaten sollten anschließend mittels qRT-PCR im Validierungskollektiv unabhängig voneinander validiert werden. Um die Mechanismen der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese weiter zu entschlüsseln, sollten anschließend mögliche Zielgene ermittelt und analysiert werden. Um Hinweise zu bekommen, in welchen Signalwegen die identifizierten miRNA-Kandidaten und deren Zielgene eine Rolle spielen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Zellkulturmodell entwickelt

werden. Dafür sollte in strahlentransformierten Brustzellen das ermittelte Zielgen der Kandidaten-miRNAs mittels siRNA-Transfektion herunterreguliert werden. Nach globaler mRNA-Analyse sollten mögliche funktionelle Netzwerke der durch die Herunterregulierung veränderter mRNAs erstellt werden. Um mögliche Unterschiede der strahlenassoziierten und sporadischen Mammakarzinogenese aufzudecken, sollten zum Vergleich globale mRNA-Expressionsdaten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)-Datensatzes herangezogen werden. Anhand dieser sollte ebenfalls ein funktionelles Netzwerk basierend auf Korrelationen der mRNA-Expression mit der Expression des Kandidatengens erstellt werden. Anschließend sollte dieses Netzwerk mit dem strahlenassoziierten Modell aus strahlentransformierten Brustzellen verglichen werden. Darüber hinaus sollten anhand der veränderten mRNAs Signalwege identifiziert werden, die von der Herunterregulation des Kandidatengens betroffen waren. In einem zweiten Aspekt dieser Doktorarbeit sollten mittels Array-CGH genomische Kopienzahlveränderungen in den Mammakarzinomen der strahlenexponierten und nicht exponierten Patientinnen identifiziert und verglichen werden. Schließlich sollte mit Unterstützung mathematischer Expertise ein biostatistisches Modell zur Generierung einer genomischen Kopienzahl-Signatur etabliert werden, welches es erlaubt, den Expositionsstatus einer Patientin vorherzusagen. Der daraus resultierende Kopienzahlstatus der Signatur sollten mittels *quantitative real time PCR (qPCR)* technisch validiert werden.

2 Publizierte Ergebnisse

2.1 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom zählt zu der am häufigsten diagnostizierten Krebsart bei Frauen. Trotz der fortschreitenden medizinischen und molekulargenetischen Forschung sterben immer noch viele Frauen an dieser Erkrankung. Ionisierende Strahlung stellt einen entscheidenden Risikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms dar. Knapp 30 Jahre nach der Tschernobyl-Reaktorkatastrophe konnte ein signifikanter Anstieg der Brustkrebsrate bei Liquidatorinnen aus der Ukraine im nationalen Vergleich beobachtet werden. Die molekularen Mechanismen der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese sind bis heute jedoch weitestgehend unklar. Ein Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von differenziell exprimierten miRNAs und deren gemeinsamer Zielgene/Zielproteine in Mammakarzinomen von strahlenexponierten und nicht exponierten Patientinnen, die mögliche strahlenspezifische Marker darstellen könnten. Dafür wurden Mammakarzinom-Gewebe von Liquidatorinnen, die im Rahmen der Tschernobyl-Katastrophe eingesetzt waren, als auch Bewohnerinnen kontaminiert Regionen analysiert. Zum Vergleich wurden auch die Mammakarzinom-Gewebe von Patientinnen ohne Strahlenvorgeschichte untersucht. Das Patientinnenkollektiv ohne Strahlenvorgeschichte war hinsichtlich des Alters, Tumortyps, Residenz (Ukraine), histologischem Grading und TNM-Klassifizierung an das bestrahlte Patientinnenkollektiv angeglichen. Für einen Teil des strahlenexponierten Kollektivs konnten mittels der RADRUE-Methode die Dosen, mit denen die Patientinnen exponiert wurden, rekonstruiert werden. Strahlenassoziierte Veränderungen in der Expression von miRNAs, welche im Untersuchungskollektiv (n=76) identifiziert wurden (hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p und hsa-miR-26b-5p), konnten teilweise in einem Validierungskollektiv (n=78) validiert werden. Dabei konnte in beiden Kollektiven gezeigt werden, dass hsa-miR-26b-5p in der exponierten Gruppe im Ver-

gleich zur nicht exponierten Gruppe signifikant überexprimiert war. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation des validierten Zielproteins dieser miRNA, TRPS1, ebenfalls mit der Strahlenexposition der Patientinnen assoziiert war. Da eine Überexpression des TRPS1-Proteins in sporadischem Brustkrebs häufig auftritt und in der Literatur bereits gut beschrieben ist, sollte die Bedeutung der beobachteten Herunterregulation des Proteins in strahlenassoziierten Brustkrebs aufgeschlüsselt werden. Zur Bestimmung der Funktion von TRPS1 im strahlenassoziierten Brustkrebs wurde der Einfluss von *TRPS1* auf das Transkriptom mittels *mRNA-microarray* in zwei strahlentransformierten Brustzelllinien nach *siRNA-knockdown* analysiert. Gene, die nach *TRPS1-knockdown* dereguliert vorlagen, waren mit folgenden biologischen Prozessen assoziiert: DNA-Reparatur, Zellzyklus, Mitose, Zellmigration, Angiogenese und epithelial-mesenchymaler Transition (EMT). Des Weiteren wurden die Interaktionspartner von *TRPS1* aus Gen-Korrelationsnetzwerken von Genexpressionsdaten der strahlentransformierten Brustzelllinien B42-11 und B42-16 und sporadischem Brustkrebsgewebe der TCGA-Datenbank identifiziert. Die Gene, welche mit *TRPS1* in den strahlentransformierten Brustzelllinien korrelierten, waren hauptsächlich mit biologischen Prozessen der DNA-Schadensantwort und Chromosomensegregation verknüpft. Die transkriptionellen Interaktionspartner der sporadischen Mammakarzinome waren vorwiegend mit dem Prozess der Apoptose assoziiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines neu etablierten statistischen Modells, eine genomische Kopienzahl-Signatur zu finden, mit welcher der Expositionsstatus eines Patienten bestimmt werden kann. Zunächst wurden an den bereits vorgestellten Mammakarzinom-Kollektiven (Untersuchungskollektiv und Validierungs-kollektiv) von Liquidatorinnen und Bewohnerinnen kontaminiert Gebiete sowie von Patientinnen ohne Strahlenvorgeschichte die genomischen Kopienzahlveränderungen mittels Array-CGH bestimmt. In einem nächsten Schritt konnte mit Unterstützung mathematischer Expertise eine biostatistische Methode generiert werden, über die eine genomische Kopienzahl-Signatur entwickelt wurde. Die Signatur ermöglicht es,

den Expositionsstatus einer Patientin vorherzusagen. Mit Hilfe eines *stepwise combined forward-backward selection approach* wurde eine genomische Kopienzahl-Signatur mit geringer Komplexität im Trainingsset (n=68) identifiziert, welche anschließend im Validierungsset (n=68) validiert werden konnte. Die Signatur bestand aus neun Kopienzahlregionen, welche in folgenden chromosomal Banden lokalisiert waren: 7q11.22-11.23, 7q21.3, 16q24.3, 17q21.31, 20p11.23-11.21, 1p21.1, 2q35, 2q35, 6p22.2. Der Kopienzahlstatus der Signatur konnte mittels qPCR technisch validiert werden. Zusammenfassend konnte eine genomische Kopienzahl-Signatur nachgewiesen werden, welche die Identifikation von strahlenassoziiertem Brustkrebs auf individuellem Level erlaubt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und Erkenntnisse stellen einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese dar. Es konnten molekulare Marker und Mechanismen der strahlenassoziierten Mammakarzinogenese aufgedeckt werden, welche für die Diagnose von strahlenassoziierten Mammakarzinomen und für mechanistische Risikomodelle eingesetzt werden könnten.

2.2 Summary

Breast cancer is one of the most common diagnosed types of cancer in women. Despite the recent advances in medical and molecular research, many women die as a consequence of this disease. Ionizing radiation represents a critical risk factor for the development of breast cancer. A significant increase in the rate of breast cancer of clean-up workers was determined in an epidemiologic study almost 30 years after the nuclear disaster of Chernobyl. However, the molecular mechanisms in radiation associated breast cancer are largely unclear. One aim of this thesis was to detect differentially expressed miRNAs and their common target genes/proteins of exposed and non-exposed patients, which could represent possible radiation associated markers. For this purpose, post-Chernobyl breast cancer tissues from radiation exposed female

clean-up workers and evacuees have been analyzed and compared to breast cancer tissues of non-exposed patients. Exposed patients and non-exposed controls for this study were frequency matched for age, tumor type, residence (Ukraine), histological grading and TNM-classification. The absorbed doses for some of the patients were reconstructed by the RADRUE-method of the radiation exposed cohort. Radiation associated alterations of miRNA expressions were identified in the discovery cohort (n=76, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p and hsa-miR-26b-5p) and could be partially validated in the validation cohort (n=78). Hsa-miR-26b-5p was significantly overexpressed in the exposed group compared to the non-exposed group in both of the cohorts. Furthermore, it was demonstrated, that a downregulation of the validated target protein TRPS1 of hsa-miR-26b-5p was associated with radiation exposure as well. A downregulation of TRPS1 in radiation associated breast cancer needed further clarification, since an overexpression of the TRPS1-protein in sporadic breast cancer is quite common and reported in the published literature. For this purpose, the impact of *TRPS1* on the transcriptome was characterized by a global mRNA expression analysis in two radiation-transformed breast cell culture models (B42-11, B42-16) after a siRNA-knockdown of *TRPS1* expression. Differentially expressed genes upon *TRPS1* knockdown were associated with crucial cellular functions such as mitosis, cell cycle, DNA-repair, cell migration, angiogenesis and EMT. Moreover differences in the transcriptomic *TRPS1* correlation networks between sporadic breast cancers (transcriptome data from TCGA) and radiation transformed breast cells were explored. The genes correlating with *TRPS1* in the sporadic breast cancers revealed an association with apoptosis. The transcriptional interaction partners in the radiation-transformed breast cell lines were mostly linked to chromosome segregation and DNA damage response.

Another aim of this thesis was to develop a signature from genomic copy number alterations (CNA) using a newly established statistical model that predicts the exposure status of patients. In a first step, the CNAs of the exposed breast cancer cohorts (discovery cohort and validation cohort) and of non-exposed patients were deter-

mined using array-CGH. In a next step, a forward-backward selection approach was used to develop a signature from the genomic CNAs that is predictive for the exposure status of patients. The resulting signature was selected in a training data set (n=68) with a smallest possible complexity and consisted of nine copy number regions. It could be subsequently validated in an independent validation data set (n=68). The nine copy number regions of the signature are located on chromosomal bands 7q11.22-11.23, 7q21.3, 16q24.3, 17q21.31, 20p11.23-11.21, 1p21.1, 2q35, 2q35, 6p22.2. The copy number status of the nine signature CNAs was technically validated by qPCR.

The markers discovered in this thesis at different molecular levels represent an important contribution to the research in the field of radiation associated breast cancer. The molecular markers point to specific mechanisms of radiation associated breast carcinogenesis and can be further used for inclusion in mechanistic risk models that determine radiation related risks for the development of breast cancer.

2.3 Beschreibung des Journals International Journal of Cancer

2.3.1 International Journal of Cancer

Das International Journal of Cancer (ISI Abkürzung: Int. J. Cancer) publiziert Forschungsergebnisse aus den Bereichen der experimentellen und klinischen Krebsforschung. Der Fokus des Journals liegt auf folgenden Aspekten: Krebsentstehung, Krebszellbiologie, Krebsgenetik, infektiöse Krebsursachen, Tumorimmunologie, Früherkennung und Diagnose, Epidemiologie und Krebstherapie.

Das erstmals 1966 erschienene Journal wird von Prof. Dr. Peter Lichten geführt und hat einen *impact factor* von 7,360 (2017/2018).

2.3.2 Radiation and Environmental Biophysics

Das Journal Radiation and Environmental Biophysics (ISI Abkürzung: Radiat. Environ. Biophys.) publiziert Forschungsergebnisse aus den Bereichen Biophysik und Strahlenbiologie. Der Fokus des Journals liegt auf folgenden Aspekten: Gesundheits- und Biophysik, Umweltschutz, Strahlenschutz, Ökosysteme, Risikoabschätzung und angewandte Strahlenforschung.

Das erstmals 1963 erschienene Journal wird von PD Dr. Anna Friedl, Prof. Dr. Werner Rühm und Prof. Dr. Andrzej Wojcik geführt. 2017 betrug der *impact factor* 1,527.

2.4 Eigener Beitrag zu den Publikationen

2.4.1 International Journal of Cancer

An der Arbeit „Expression of miRNA-26b-5p and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer“, publiziert im International Journal of Cancer, beträgt der von mir durchgeführte Anteil die experimentelle Durchführung von RNA- und DNA-Isolation aus *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE)-Gewebeschnitten mit anschließender qRT-PCR und Immunhistochemie sowie die

Durchführung von Zellkulturexperimenten mit siRNA-Transfektion und anschließender qRT-PCR, Western Blot und *mRNA-microarrays* inklusive Probenvorbereitung, Datenerfassung, statistischer Auswertungen, Erstellen von Abbildungen und Verfassen des Manuskripts.

An der Arbeit „A genomic copy number signature predicts radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer“, publiziert im International Journal of Cancer, beträgt der von mir durchgeführte Anteil die experimentelle Durchführung von DNA-Isolation aus FFPE-Gewebeschnitten mit anschließender Array-CGH sowie qPCR inklusive Datenerfassung, statistischer Auswertungen, Erstellen von Abbildungen und Verfassen des Manuskripts. Die geteilte Erstautorenschaft berücksichtigt große Anteile der statistischen Methodenentwicklung für die Generierung der genomischen Kopienzahl-Signatur in strahlenassoziierten Mammakarzinomen. Dieser Beitrag wurde von einem Mathematiker geleistet.

2.4.2 Radiation and Environmental Biophysics

An der Arbeit „Doses of Ukrainian female clean-up workers with diagnosed breast cancer“, publiziert im Journal Radiation and Environmental Biophysics, beträgt der von mir durchgeführte Anteil die Datenerfassung und Erstellung von Tabellen für das Manuskript.

2.5 Publikationen

2.5.1 Publikation 1: Expression of miRNA-26b-5p and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer

Wilke CM, Hess J, Klymenko SV, Chumak VV, Zakhartseva LM, Bakhanova EV, Feuchtinger A, Walch AK, Selmansberger M, Braselmann H, Schneider L, Pitea A, Steinhilber J, Fend F, Bösmüller HC, Zitzelsberger H, Unger K

Int J Cancer 2018;142(3):573-83

doi: 10.1002/ijc.31072

2.5.2 Publikation 2: A genomic copy number signature predicts radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer

Wilke CM[†], Braselmann H[†], Hess J, Klymenko SV, Chumak VV, Zakhartseva LM, Bakhanova EV, Walch, AK, Selmansberger M, Samaga D, Weber P, Schneider L, Fend F, Bösmüller HC, Zitzelsberger H, Unger K

Int J Cancer 2018;143(6):1505-15

doi: 10.1002/ijc.31533

2.5.3 Publikation 3: Doses of Ukrainian female clean-up workers with diagnosed breast cancer

Chumak VV, Klymenko SV, Zitzelsberger H, Wilke C, Rybchenko LA, Bakhanova EV

Radiat Environ Biophys 2018;57(2):163-68

doi: 10.1007/s00411-018-0738-5

3 Schlussfolgerung und Ausblick

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis von differenziell exprimierten miRNAs und deren gemeinsamer Zielgene/Zielproteine in Mammakarzinomen von strahlenexponierten und nicht exponierten Patientinnen. Mit diesem Ansatz sollten mögliche strahlenspezifische Marker entschlüsselt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben die differenziell exprimierte miRNA hsa-miR-26b-5p (Hochregulation) und das differenziell exprimierte Zielprotein TRPS1 (Herunterregulation). Die Resultate wiesen zudem darauf hin, dass die Herunterregulation von *TRPS1* die Expression einer Reihe von mRNAs beeinflusst, welche in Prozessen wie Zellzyklus, Mitose, Zellmigration, Angiogenese und EMT eine Rolle spielen. Des Weiteren sind *TRPS1* und dessen Interaktionspartner in Prozesse der DNA-Reparatur und Chromosomensegregation involviert. In einem weiteren Aspekt dieser Doktorarbeit konnte mit Unterstützung mathematischer Expertise eine statistische Methode etabliert werden. Die Methode erlaubt, anhand einer genomischen Kopienzahl-Signatur, den Expositionsstatus eines Patienten zu bestimmen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt somit mögliche molekulare Strahlenmarker in Mammakarzinomen. Nach einem allgemein anerkannten und vor kurzem publizierten Strategieplan zur Entwicklung von Strahlenmarkern müssen verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen werden. Die Marker der vorliegenden Arbeit befinden sich dabei im ersten Schritt (*Discovery*) und erfordern eine weitere Optimierung und Validierung. Dazu müssen in einem nächsten Schritt (*Development*) *standard operating procedures* (SOPs) für die Marker entwickelt werden, die eine Reproduzierbarkeit und eine Vergleichbarkeit der Analysen in verschiedenen Laboren gewährleisten können sowie die Verteilung der Marker im Gewebe und die dynamische Bandbreite der Expression aufzeigen müssen. In einem anschließenden Validierungsschritt (*Validation*) muss geprüft werden, ob die Marker auch in weiteren unabhängigen Kollektiven und in verschiedenen Laboren validiert werden können. Bevor der Biomarker schließlich

in molekularen, epidemiologischen Studien eingesetzt werden kann (*Application*), muss dieser in prospektiven Studien getestet werden (*Qualification*).⁷⁴

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Strahlenmarker könnten in der Diagnostik von strahlenassoziierten Mammakarzinomen eingesetzt werden. Eine klinische Anwendung der nachgewiesenen, strahlenassoziierten, molekularen Veränderungen setzt, wie oben aufgeführt, jedoch deren Validierung in weiteren größeren unabhängigen Patientenkollektiven und eine Etablierung standardisierter Nachweisverfahren voraus. Im Rahmen des Projektes dieser Doktorarbeit wurde noch ein weiteres Patientinnenkollektiv untersucht. Dieses unabhängige Validierungskollektiv setzte sich wiederum aus strahlenassoziierten Mammakarzinom-Geweben von Liquidatorinnen und Bewohnerinnen kontaminiert Regionen des Tschernobyl-Unfalls zusammen. Ferner wurden Brustkrebs-Gewebeproben von Arbeiterinnen der kerntechnischen Anlage Majak in Russland in die Untersuchung einbezogen. In der kerntechnischen Anlage Majak wurden die Produktion von Radionukliden und die Wiederaufarbeitung von Kernbrennstoffen durchgeführt. Als Folge des Kyschtym-Unfalls im Jahr 1957 gelangten sehr große Mengen an radioaktiven Substanzen in die Atmosphäre, mit denen die Majak-Arbeiterinnen exponiert wurden¹¹³. Die Expression der Strahlenmarker hsa-miR-26b-5p und TRPS1 sowie die Vorhersage des Expositionsstatus anhand der genetischen Kopienzahl-Signatur wurden in diesem weiteren Validierungskollektiv bestimmt und bestätigten die Befunde der ursprünglich publizierten Analysen. Die Daten des zweiten Validierungskollektivs sind bislang jedoch noch nicht publiziert und wurden deshalb nicht im Rahmen dieser kumulativen Dissertation dargestellt. Basierend auf diesen ermutigenden Ergebnissen sollten weitere Validierungs-Studien in der Weise vorangetrieben werden, dass auch Kollektive von Patientinnen, die nach einer Strahlentherapie zur Behandlung eines Non-Hodgkin-Lymphoms als Sekundärtumor ein Mammakarzinom entwickelt haben, einbezogen und untersucht werden. Auch Brustkrebsfälle von Hämangioma-Patientinnen, welche in jungen Jahren einer therapeutischen Bestrahlung ausgesetzt waren, würden sich sehr gut als weiteres Validierungskollektiv eignen. Eine zusätzliche Untersuchung sollte eine dosisabhängi-

ge Ausprägung des Markers in den Blick nehmen. Die Rekonstruierung der Strahlendosen, mit denen die Patientinnen der vorliegenden Studie exponiert wurden, ist mit großer Unsicherheit versehen. Dabei wäre ein Vorteil der oben erwähnten klinischen Kollektive, dass die Dosen der Bestrahlungsfelder, in denen sich zu einem späteren Zeitpunkt ein Mammakarzinom entwickelt hat, sehr genau und zuverlässig bestimmt werden können.

Ein innovativer Aspekt dieser Dissertation war die Etablierung einer genomischen Kopienzahl-Signatur. Diese Signatur ermöglicht den Expositionsstatus einer Patientin in Mammakarzinomen zu bestimmen. Bisher war es gängige Praxis aus kontinuierlichen Variablen (mRNA- und miRNA-Expressionsdaten) Signaturen für prognostische Endpunkte im Mammakarzinom zu entwickeln^{107, 109}. Es gab bisher jedoch keinen Forschungsansatz, um eine Signatur zur Vorhersage eines klinischen Endpunkts in Mammakarzinomen aus binären bzw. kategorischen Variablen, wie dem Kopienzahlstatus, zu etablieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine multivariate logistische Regressionsanalyse zur binären Klassifikation der Strahlenexposition für die Generierung einer genomischen Kopienzahl-Signatur im Mammakarzinom mit Hilfe mathematischer Expertise entwickelt (siehe Material und Methoden Teil, Wilke et al., 2018). Dieses biostatistische Modell kann in Zukunft als Methode zur Detektion von genomischen Kopienzahl-Signaturen für die binäre Klassifizierung in verschiedenen Tumorentitäten angewendet werden. Des Weiteren ist eine Integration der Kopienzahldaten mit Transkriptomdaten geplant, die es erlauben, mögliche neue molekulare Subtypen von strahlenassoziierten Mammakarzinomen zu bestimmen. Globale Genexpressionsdaten würden, zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, einen wichtigen Schritt zur Aufklärung der molekularen Mechanismen von strahlenassoziiertem Brustkrebs leisten.

Die in dieser Promotionsarbeit nachgewiesenen molekularen Strahlenmarker eröffnen somit die Möglichkeit einer Integration in epidemiologische Studien, um das Brustkrebsrisiko, vor allem im niedrigen Dosisbereich besser bewerten zu können. Damit wäre eine genauere Risikovorhersage möglich, wie sie bei strahlenassoziierten

Schilddrüsentumoren schon gezeigt werden konnte¹¹⁴. Epidemiologische Risikoabschätzungen zur Krebsentstehung nach medizinischer, diagnostischer Bestrahlung im niedrigen Strahlendosenbereich wurden bereits von Brenner et al. durchgeführt. Sie postulierten, dass insbesondere junge Patienten, welche wiederholt computertomographischen Untersuchungen ausgesetzt waren, ein erhöhtes Krebsrisiko haben^{115, 116}. Basierend auf solchen epidemiologischen Studien können die identifizierten Strahlenmarker in bereits bestehende mechanistische Risikomodelle integriert und die Risikoabschätzung für ein strahleninduziertes Mammakarzinom verbessert werden.

4 Literaturverzeichnis

1. Tao ZQ, Shi AM, Lu CT, Song T, Zhang ZG, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys* 2015;72:333-38.
2. Silva O.E. ZS. Brustkrebs - Diagnostik und Therapieed.: Elsevier Urban&Fischer Verlag, 2007.
3. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)* 2013;8:149-54.
4. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010;10:955-60.
5. McCart Reed AE, Kutasovic JR, Lakhani SR, Simpson PT. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Res* 2015;17:12.
6. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* 2015;5:2929-43.
7. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001;358:1389-99.
8. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005;9:208-21.
9. Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, Lane DS, Johnson KC, Wactawski-Wende J, Chen C, Qi L, Yasmeen S, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:526-35.
10. Beaber EF, Malone KE, Tang MT, Barlow WE, Porter PL, Daling JR, Li CI. Oral contraceptives and breast cancer risk overall and by molecular subtype among young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:755-64.
11. Macacu A, Autier P, Boniol M, Boyle P. Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2015;154:213-24.
12. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490:61-70.
13. Kapoor NS, Curcio LD, Blakemore CA, Bremner AK, McFarland RE, West JG, Banks KC. Multigene Panel Testing Detects Equal Rates of Pathogenic BRCA1/2 Mutations and has a Higher Diagnostic Yield Compared to Limited BRCA1/2 Analysis Alone in Patients at Risk for Hereditary Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 2015;22:3282-8.
14. Genetics of Breast and Gynecologic Cancers (PDQ(R)): Health Professional Version PDQ Cancer Information Summarised. Bethesda (MD), 2002.
15. Kleibl Z, Kristensen VN. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast* 2016;28:136-44.

16. Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000;21:397-404.
17. Boyce. Ionizing radiation and breast cancer risk. Sprecher Institute for Comparative Cancer Research 2004;52.
18. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res* 2005;7:21-32.
19. Drooger JC, Hooning MJ, Seynaeve CM, Baaijens MH, Obdeijn IM, Sleijfer S, Jager A. Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a critical review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2015;41:187-96.
20. Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, Mabuchi K, Kodama K. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat Res* 2007;168:1-64.
21. Hsu WL, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, Kimura A, Kamada N, Dohy H, Tomonaga M, Iwanaga M, Miyazaki Y, et al. The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001. *Radiat Res* 2013;179:361-82.
22. Kamiya K, Ozasa K, Akiba S, Niwa O, Kodama K, Takamura N, Zaharieva EK, Kimura Y, Wakeford R. Long-term effects of radiation exposure on health. *Lancet* 2015;386:469-78.
23. Land CE, Tokunaga M, Koyama K, Soda M, Preston DL, Nishimori I, Tokuoka S. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990. *Radiation Research* 2003;160:707-17.
24. Dondon MG, de Vathaire F, Shamsaldin A, Doyon F, Diallo I, Ligot L, Paoletti C, Labbe M, Abbas M, Chavaudra J, Avril MF, Fragu P, et al. Cancer mortality after radiotherapy for a skin hemangioma during childhood. *Radiother Oncol* 2004;72:87-93.
25. Furst CJ, Silfversward C, Holm LE. Mortality in a cohort of radiation treated childhood skin hemangiomas. *Acta Oncol* 1989;28:789-94.
26. Lindberg S, Karlsson P, Arvidsson B, Holmberg E, Lunberg LM, Wallgren A. Cancer incidence after radiotherapy for skin haemangioma during infancy. *Acta Oncol* 1995;34:735-40.
27. Lundell M, Mattsson A, Karlsson P, Holmberg E, Gustafsson A, Holm LE. Breast cancer risk after radiotherapy in infancy: a pooled analysis of two Swedish cohorts of 17,202 infants. *Radiat Res* 1999;151:626-32.
28. Kleinerman RA. Cancer risks following diagnostic and therapeutic radiation exposure in children. *Pediatr Radiol* 2006;36 Suppl 2:121-5.
29. Carmichael A, Sami AS, Dixon JM. Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. *European Journal of Surgical Oncology* 2003;29:475-79.
30. Ibrahim EM, Abouelkhair KM, Kazkaz GA, Elmasri OA, Al-Foheidi M. Risk of second breast cancer in female Hodgkin's lymphoma survivors: a meta-analysis. *Bmc Cancer* 2012;12.

31. Boice JD, Jr., Preston D, Davis FG, Monson RR. Frequent chest X-ray fluoroscopy and breast cancer incidence among tuberculosis patients in Massachusetts. *Radiat Res* 1991;125:214-22.
32. Hoffman DA, Lonstein JE, Morin MM, Visscher W, Harris BS, 3rd, Boice JD, Jr. Breast cancer in women with scoliosis exposed to multiple diagnostic x rays. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1307-12.
33. Pauwels EK, Foray N, Bourguignon MH. Breast Cancer Induced by X-Ray Mammography Screening? A Review Based on Recent Understanding of Low-Dose Radiobiology. *Med Princ Pract* 2016;25:101-9.
34. Cardis E, Howe G, Ron E, Bebeshko V, Bogdanova T, Bouville A, Carr Z, Chumak V, Davis S, Demidchik Y, Drozdovitch V, Gentner N, et al. Cancer consequences of the Chernobyl accident: 20 years on. *J Radiol Prot* 2006;26:127-40.
35. UNSCEAR. Sources and effects of ionizing radiation: UNSCEAR 2008 report to the General Assembly, with scientific annexes, 2008.
36. Ukraine Nro. Thirty Years after Chornobyl Accident: Radiological and Medical consequences. In: Ukrainian) Ki, ed., 2016.
37. Ukraine Nro. Twenty-five Years after Chornobyl Accident: Safety for the Future. In: KIM K, ed., 2011.
38. Prysiaznyuk A, Gristchenko V, Fedorenko Z, Gulak L, Fuzik M, Slipenyuk K, Tirmarche M. Twenty years after the Chernobyl accident: solid cancer incidence in various groups of the Ukrainian population. *Radiat Environ Biophys* 2007;46:43-51.
39. Prysiaznyuk AY, Bazyka DA, Romanenko AY, Gudzenko NA, Fuzik MM, Trotsyuk NK, Fedorenko ZP, Gulak LO, Slipenyuk KM, Babkina NG, Khukhriantsa OM, Goroh YL, et al. Quarter of century since the Chornobyl accident: small es, Cyrillicancer risks in affected groups of population. *Probl Radiac Med Radiobiol* 2014;19:147-69.
40. Pukkala E, Kesminiene A, Poliakov S, Ryzhov A, Drozdovitch V, Kovgan L, Kyyronen P, Malakhova IV, Gulak L, Cardis E. International Journal of Cancer 2006;119:651-58.
41. Kryuchkov V, Chumak V, Maceika E, Anspaugh LR, Cardis E, Bakhanova E, Golovanov I, Drozdovitch V, Luckyanov N, Kesminiene A, Voilleque P, Bouville A. Radrue method for reconstruction of external photon doses for Chernobyl liquidators in epidemiological studies. *Health Phys* 2009;97:275-98.
42. Romanenko A, Bebeshko V, Hatch M, Bazyka D, Finch S, Dyagil I, Reiss R, Chumak V, Bouville A, Gudzenko N, Zablotska L, Pilinskaya M, et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chornobyl cleanup workers from Ukraine: I. Study methods. *Radiat Res* 2008;170:691-7.
43. Romanenko AY, Finch SC, Hatch M, Lubin JH, Bebeshko VG, Bazyka DA, Gudzenko N, Dyagil IS, Reiss RF, Bouville A, Chumak VV, Trotsiuk NK, et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chornobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks. *Radiat Res* 2008;170:711-20.

44. Kesminiene A, Evrard AS, Ivanov VK, Malakhova IV, Kurtinaitis J, Stengrevics A, Tekkel M, Anspaugh LR, Bouville A, Chekin S, Chumak VV, Drozdovitch V, et al. Risk of hematological malignancies among Chernobyl liquidators. *Radiat Res* 2008;170:721-35.

45. Chumak VV, Romanenko AY, Voilleque PG, Bakhanova EV, Gudzenko N, Hatch M, Zablotska LB, Golovanov IA, Luckyanov NK, Sholom SV, Kryuchkov VP, Bouville A. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chornobyl cleanup workers from Ukraine: II. Estimation of bone marrow doses. *Radiat Res* 2008;170:698-710.

46. Chumak VV, Klymenko SV, Zitzelsberger H, Wilke C, Rybchenko LA, Bakhanova EV. Doses of Ukrainian female clean-up workers with diagnosed breast cancer. *Radiat Environ Biophys* 2018;57:163-68.

47. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.

48. Chang MC, Souter LH, Kamel-Reid S, Rutherford M, Bedard P, Trudeau M, Hart J, Eisen A, Molecular Oncology Advisory C. Clinical utility of multigene profiling assays in early-stage breast cancer. *Curr Oncol* 2017;24:e403-e22.

49. Vieira AF, Schmitt F. An Update on Breast Cancer Multigene Prognostic Tests-Emergent Clinical Biomarkers. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:248.

50. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160-7.

51. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 2010;23 Suppl 2:S60-4.

52. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R68.

53. Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2001;11:339-52.

54. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004;9:606-16.

55. Ali SH, O'Donnell AL, Balu D, Pohl MB, Seyler MJ, Mohamed S, Mousa S, Dandona P. Estrogen receptor-alpha in the inhibition of cancer growth and angiogenesis. *Cancer Res* 2000;60:7094-8.

56. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: Continuing progress and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:1616-22.

57. Aktories K. FU, Hofmann F., Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologieed., vol. 10. Auflage: Elsevier München, 2009.

58. Kumler I, Tuxen MK, Nielsen DL. A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2014;40:259-70.

59. Hudis CA. Drug therapy: Trastuzumab - Mechanism of action and use in clinical practice. *New Engl J Med* 2007;357:39-51.
60. Baselga J, Albanell J, Molina MA, Arribas J. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Seminars in Oncology* 2001;28:4-11.
61. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 2002;416:279-80.
62. Cooley S, Burns LJ, Repka T, Miller JS. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol* 1999;27:1533-41.
63. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993;71:3926-31.
64. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010;11:174-83.
65. Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr-Relat Cancer* 2000;7:143-64.
66. Qu J, Zhao X, Wang J, Liu X, Yan Y, Liu L, Cai H, Qu H, Lu N, Sun Y, Wang F, Wang J, et al. MYC overexpression with its prognostic and clinicopathological significance in breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:93998-4008.
67. Miura S, Nakashima M, Ito M, Kondo H, Meirmanov S, Hayashi T, Soda M, Matsuo T, Sekine I. Significance of HER2 and C-MYC oncogene amplifications in breast cancer in atomic bomb survivors: associations with radiation exposure and histologic grade. *Cancer* 2008;112:2143-51.
68. Oikawa M, Yoshiura K, Kondo H, Miura S, Nagayasu T, Nakashima M. Significance of genomic instability in breast cancer in atomic bomb survivors: analysis of microarray-comparative genomic hybridization. *Radiation Oncology* 2011;6.
69. Horst KC, Hancock SL, Ognibene G, Chen C, Advani RH, Rosenberg SA, Donaldson SS, Hoppe RT. Histologic subtypes of breast cancer following radiotherapy for Hodgkin lymphoma. *Annals of Oncology* 2014;25:848-51.
70. Yang XR, Killian JK, Hammond S, Burke LS, Bennett H, Wang Y, Davis SR, Strong LC, Neglia J, Stovall M, Weathers RE, Robison LL, et al. Characterization of Genomic Alterations in Radiation-Associated Breast Cancer among Childhood Cancer Survivors, Using Comparative Genomic Hybridization (CGH) Arrays. *Plos One* 2015;10.
71. Broeks A, Braaf LM, Wessels LF, van de Vijver M, De Bruin ML, Stovall M, Russell NS, van Leeuwen FE, Van 't Veer LJ. Radiation-associated breast tumors display a distinct gene expression profile. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;76:540-7.
72. Selmansberger M, Feuchtinger A, Zurnadzhy L, Michna A, Kaiser JC, Abend M, Brenner A, Bogdanova T, Walch A, Unger K, Zitzelsberger H, Hess J. CLIP2 as radiation biomarker in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2015;34:3917-25.
73. Pernot E, Hall J, Baatout S, Benotmane MA, Blanchardon E, Bouffler S, El Saghire H, Gomolka M, Guertler A, Harms-Ringdahl M, Jeggo P, Kreuzer M, et al. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat Res-Rev Mutat* 2012;751:258-86.

74. Hall J, Jeggo PA, West C, Gomolka M, Quintens R, Badie C, Laurent O, Aerts A, Anastasov N, Azimzadeh O, Azizova T, Baatout S, et al. Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies - An update. *Mutat Res* 2017;771:59-84.
75. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2017;9:852.
76. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011;717:85-90.
77. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011;12:99-110.
78. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2015;7:598-616.
79. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavare S, Caldas C, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 2007;8:R214.
80. Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev* 1991;5:1813-24.
81. miRBase. miRBase: the microRNA database: Available from: www.mirbase.org.
82. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 2009;19:92-105.
83. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences* 2007;32:189-97.
84. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;11:597-610.
85. Wienholds E, Plasterk RHA. MicroRNA function in animal development. *Febs Letters* 2005;579:5911-22.
86. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524-9.
87. Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2009;84:55-71.
88. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:259-69.
89. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-70.
90. Leung AK, Sharp PA. microRNAs: a safeguard against turmoil? *Cell* 2007;130:581-5.
91. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12:861-74.

92. Leung CM, Chen TW, Li SC, Ho MR, Hu LY, Liu WS, Wu TT, Hsu PC, Chang HT, Tsai KW. MicroRNA expression profiles in human breast cancer cells after multifraction and single-dose radiation treatment. *Oncol Rep* 2014;31:2147-56.

93. Stankevicius L, Almeida da Silva AP, Ventura Dos Passos F, Dos Santos Ferreira E, Menks Ribeiro MC, M GD, E JP, Ferreira-Machado SC, Vassetzky Y, de Almeida CE, de Moura Gallo CV. MiR-34a is up-regulated in response to low dose, low energy X-ray induced DNA damage in breast cells. *Radiat Oncol* 2013;8:231.

94. Meng C, Liu Y, Shen Y, Liu S, Wang Z, Ye Q, Liu H, Liu X, Jia L. MicroRNA-26b suppresses autophagy in breast cancer cells by targeting DRAM1 mRNA, and is downregulated by irradiation. *Oncol Lett* 2018;15:1435-40.

95. Deng G, Sui G. Noncoding RNA in oncogenesis: a new era of identifying key players. *Int J Mol Sci* 2013;14:18319-49.

96. Halimi M, Parsian H, Asghari SM, Sariri R, Moslemi D, Yeganeh F, Zabihi E. Clinical translation of human microRNA 21 as a potential biomarker for exposure to ionizing radiation. *Transl Res* 2014;163:578-84.

97. Halimi M, Shahabi A, Moslemi D, Parsian H, Asghari SM, Sariri R, Yeganeh F, Zabihi E. Human serum miR-34a as an indicator of exposure to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys* 2016;55:423-29.

98. Wilke CM, Hess J, Klymenko SV, Chumak VV, Zakhartseva LM, Bakhanova EV, Feuchtinger A, Walch AK, Selmannberger M, Braselmann H, Schneider L, Pitea A, et al. Expression of miRNA-26b-5p and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. *Int J Cancer* 2018;142:573-83.

99. Darmon E, Leach DRF. Bacterial Genome Instability. *Microbiol Mol Biol R* 2014;78:1-39.

100. Walker LC, Wiggins GA, Pearson JF. The Role of Constitutional Copy Number Variants in Breast Cancer. *Microarrays (Basel)* 2015;4:407-23.

101. Arlt MF, Rajendran S, Birkeland SR, Wilson TE, Glover TW. Copy number variants are produced in response to low-dose ionizing radiation in cultured cells. *Environ Mol Mutagen* 2014;55:103-13.

102. Srihari S, Kalimutho M, Lal S, Singla J, Patel D, Simpson PT, Khanna KK, Ragan MA. Understanding the functional impact of copy number alterations in breast cancer using a network modeling approach. *Mol Biosyst* 2016;12:963-72.

103. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Graf S, Ha G, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012;486:346-52.

104. Natrajan R, Weigelt B, Mackay A, Geyer FC, Grigoriadis A, Tan DS, Jones C, Lord CJ, Vatcheva R, Rodriguez-Pinilla SM, Palacios J, Ashworth A, et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:575-89.

105. Li MH, Fu SB, Xiao HS. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2015;36:1200-11.

106. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
107. Knauer M, Mook S, Rutgers EJ, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, Koornstra RH, Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, van 't Veer LJ. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:655-61.
108. Sinn P, Aulmann S, Wirtz R, Schott S, Marme F, Varga Z, Lebeau A, Kreipe H, Schneeweiss A. Multigene Assays for Classification, Prognosis, and Prediction in Breast Cancer: a Critical Review on the Background and Clinical Utility. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2013;73:932-40.
109. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, Benes V, Schmidt S, Blake J, Ball G, Kerin MJ. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11:R27.
110. Pronold M, Vali M, Pique-Regi R, Asgharzadeh S. Copy number variation signature to predict human ancestry. *Bmc Bioinformatics* 2012;13:336.
111. Sung CO, Sohn I. The expression pattern of 19 genes predicts the histology of endometrial carcinoma. *Sci Rep* 2014;4:5174.
112. Wilke CM, Braselmann H, Hess J, Klymenko SV, Chumak VV, Zakhartseva LM, Bakhanova EV, Walch AK, Selmansberger M, Samaga D, Weber P, Schneider L, et al. A genomic copy number signature predicts radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. *Int J Cancer* 2018;143:1505-15.
113. Dietz M.C. BM, Groneberg D. A., Bendels M.H.K. Folgen der sowjetischen Plutoniumproduktion in der Anlage von Majak. *Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergonomie* 2017;67:270-74.
114. Kaiser JC, Meckbach R, Eidemuller M, Selmansberger M, Unger K, Shpak V, Blettner M, Zitzelsberger H, Jacob P. Integration of a radiation biomarker into modeling of thyroid carcinogenesis and post-Chernobyl risk assessment. *Carcinogenesis* 2016;37:1152-60.
115. Brenner DJ, Hall EJ. Cancer risks from CT scans: now we have data, what next? *Radiology* 2012;265:330-1.
116. Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography--an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med* 2007;357:2277-84.

5 Danksagung

Ganz herzlich danke ich allen, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst Zitzelsberger, meinem Doktorvater, und meinem Gruppenleiter Dr. Kristian Unger für die hervorragende Betreuung und die großartige Unterstützung während meiner Promotion.

Danke sagen möchte ich auch ganz besonders Frau Dr. Julia Heß-Rieger, für ihre stetige Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung.

Ein riesiges Dankeschön geht an das gesamte Team der Abteilung für Strahlenzytogenetik für das angenehme Arbeitsklima, die tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Herzlichen Dank an Laura Daijka, Claire Innerlohinger, Aaron Selmeier, Isabella Zagorski, Doris Mittermaier, Steffen Heuer, Randolph Caldwell, Daniel Piehlmaier, Dr. Martin Selmansberger, Herbert Braselmann, Daniel Samaga, Dr. Peter Weber, Valentina Leone, Lisa Kreutzer, Adriana Pitea, Theresa Heider, Dr. Verena Zangen, Marion Böttner und Giesela Dettweiler und den ehemaligen Mitarbeitern Elke Konhäuser, Ludmila Wintergerst, Dr. Isolde Summerer, Dr. Sebastian Kuger, Dr. Roland Wunderlich, Igor Gimenez-Aznar, Dr. Agata Michna und Sonia Ehr. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Zimmerkollegin Ludmila Wintergerst für ihre fachliche als auch moralische Unterstützung bedanken. Ludmila Wintergerst, Laura Daijka und Daniel Piehlmaier danke ich von Herzen für die schöne Zeit während und außerhalb der Arbeitszeit.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an das Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums München. Insbesondere an Prof. Dr. Axel Walch, Dr. Annette Feuchtinger, Ulrike Buchholz und Claudia-Mareike Pflüger.

Zudem gilt mein Dank auch meinen Kollaborationspartnern Dr. Sergiy Klymenko und Dr. Vadim Chumak vom Research Center for Radiation Medicine der Ukraine in Kiev und Prof. Dr. Fend und Dr. Bösmüller vom Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums in Tübingen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Freund Felix, meiner Familie, besonders meinen Eltern, bei der Familie Weiß und meinen Freunden für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung auf meinem Weg bedanken.